

TRANSLATION CERTIFICATION

We, **AD-EX WORLDWIDE**, an industrial translation service founded in 1957, domiciled at 525 Middlefield Road, Suite 150, Menlo Park, California 94025-3458, USA, do hereby certify that:

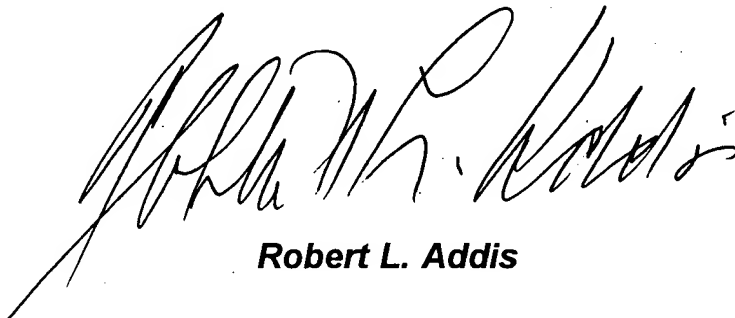
- we are internationally recognized professional translators from French into English;
- we have been serving the public in that capacity since 1957;
- the attached 18-page English text, each of whose pages is identified by WO83/02277, is a translation from French to English entirely performed by us;
- said English translation from French constitutes a complete and accurate description of the entire meaning of the printed portions of the original French-language text identified as

International Publication No. WO 83/02277
(a 20-page document published 7 July 1983)

of which a copy is appended to this English translation.

So declared with such exceptions as may be indicated in the translation.

Thus certified for and on behalf of **AD-EX Worldwide** by its Certifying Officer:



Robert L. Addis

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification³: C07H 21/00; C12N 15/00 G01N 33/50 A1	(11) International Publication Number: WO 83/02277 (43) International Publication Date: 7 July 1983 (7/7/83)
(21) International Application Number: PCT/FR82/00223 (22) International Filing Date: 29 December 1982 (12/29/82) (31) Number of the Priority Application: 81/24443 (32) Priority Date: 29 December 1981 (12/29/81) (33) Country of priority: FR (71) Applicant (for all designated states except US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75015 Paris (FR). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (US only): KOURILSKY, Philippe [FR/FR]; 207, rue de Vaugirard, F-75015 Paris (FR). VINCENT, Christian [FR/FR]; 24, rue du Hameau, F-75015 Paris (FR). TCHEN, Paul [FR/FR]; 18, rue du Télégraphe, F-92000 Nanterre (FR).	(74) Agents: GUTMANN, Ernest etc.; Cabinet Plasseraud, 84, rue d'Amsterdam, F-75009 Paris (FR). (81) Designated States: AT (European patent), BE (European patent), CH (European patent), DE (European patent), GB (European patent), JP, NL (European patent), US. Published <i>With international search report.</i>
(54) Title: DNA FRAGMENTS LABELED AT AT LEAST ONE OF THEIR ENDS BY MODIFIED RIBONUCLEOTIDES RECOGNIZABLE BY RELATED MOLECULES, AND PROCESS FOR IMPLEMENTING AN ANALYSIS OF SUCH DNA FRAGMENTS.	
(57) Abstract <p>Process for analysis of DNA sequences. It consists of fixing at one of the ends of this DNA a ribonucleotide bearing a molecule fixed covalently and bearing a modification group that can be coupled with an enzyme, permitting their later visualization in the presence of a DNA terminal transferase, treating this DNA with distinct chemical agents making it possible to perform differential cleavages within this DNA at bases, also of respectively distinct natures, collecting and separating the DNA fragments bearing the visualizable groups in a system enabling them to be sorted in order of size, and determining the unmodified terminal nucleotides of these DNA fragments, due allowance being made for the nature of the chemical agents used for the cleavage at their respective sites.</p>	

DNA fragments labeled at at least one of their ends by modified ribonucleotides recognizable by related molecules, and process for implementing an analysis of such DNA fragments.

The invention relates to DNA fragments labeled at at least one of their ends by modified nucleotide fragments, more particularly modified ribonucleotides recognizable by related molecules, and to a process for implementing a sequence analysis of such fragments.

Among the techniques for analyzing nucleotide sequences contained in a DNA, one may mention in principle the method called the MAXAM & GILBERT method (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 74, No. 2, pp. 560-564, February 1977), which method consists of subjecting the DNA being analyzed to differential cleavage reactions at the guanine and adenine bases, to cleavages in equal proportions at the cytosine and thymine bases, and finally to cleavages at the cytosine bases alone. However, this method implies that the DNA under study has previously been labeled at one of its ends by a radioactive label, notably ^{32}P , which offers the possibility, after separation of the fragments obtained after the aforesaid cleavage operations, notably by electrophoresis on a polyacrylamide gel, of reconstructing the chaining sequence of the various nucleotides of which the DNA under study was initially constructed, more particularly from autoradiographic images which can be formed on an imprintable film applied to the gel.

The difficulties involved in the autoradiographic disclosure of the cleavage products on the gel plate are well known. Because of the scattering of the radiation of the labelled isotopes in all spatial directions, a satisfactory resolution of the various migration bands in the gel requires the use of extremely thin plates. In general, the thickness of these plates does not exceed 0.3 mm. The use of thicker gel plates would entail a

rapid decrease of the resolving power of the autoradiographic process. The use of radioactivity is itself also not without danger.

The purpose of the invention is to remedy these difficulties, notably to provide a process for modifying the DNA whose sequence has to be studied, making it easier later to detect the DNA fragments that can be obtained by a sequence analysis process (such as has been reviewed above, or by any other process capable of leading to similar results).

The modified DNA according to the invention is characterized by the fact that an oligomer of modified ribonucleotides, preferably a single modified ribonucleotide, is fixed at at least one of its ends, the modification of the ribonucleotide itself consisting of a chemical molecule fixed covalently to this ribonucleotide and bearing at least one group not engaged in the aforesaid covalent bond and capable of being coupled directly or indirectly with a molecule or a product having a specific affinity for this group and consequently permitting the selective recognition of the modified DNA.

In particular, this group permits a chemical or immunological affine bond with a molecule or a product which is itself directly disclosable or capable of being disclosed in turn by coupling with another discloser product. Moreover, this group is such that it does not modify the capacity of this ribonucleotide to be fixed at the end of a DNA, in the presence of a DNA terminal transferase, when it is put into contact with this DNA under conditions permitting the fixation of one or more ribonucleotides at this end.

The invention also concerns a process for obtaining such a modified DNA, this process consisting of treating the DNA under study with such a modified ribonucleotide in the presence of at least that one of the ribonucleotides normally capable of being paired in a DNA with the ribonucleotide in question, whether or not it bears such a modification group, and of a DNA terminal transferase, if necessary, and when the product of fixation at

the end of the DNA resulting from this treatment consists of an oligomer of modified nucleotides, of eliminating the modified ribonucleotides from this possible oligomer, except for the ribonucleotide directly fixed to the terminal deoxyribonucleotide at the end of the DNA in question. This elimination is preferably done by means of an alkaline base, notably soda [sodium carbonate], under conditions permitting separation of the bonds which the ribonucleotides form between one another in this oligomer fragment.

From a DNA which at both of its ends bears ribonucleotides which are themselves modified as defined above (or from a DNA bearing them at only one of its ends), in a known manner one can obtain smaller DNA fragments either by the action of chemical agents capable of inducing cleavages, notably at determined nucleotides, or, preferably, by the action of endonucleases, notably appropriate restriction enzymes, insofar as the corresponding DNA comprises the corresponding restriction site.

The treatment of this DNA fragment with several restriction enzymes makes it possible, by recovery of the various fragments labelled at the same end, to establish a restriction map of this DNA.

When a unique restriction site corresponds to a certain restriction enzyme, the treatment of said DNA fragment by this enzyme makes it possible to obtain fragments of determined length, lending itself to an analysis of the sequence of the deoxyribonucleotides of which they are formed.

In fact, the invention also concerns, in one of its preferred applications, a process comprising the steps which consist of treating a DNA, thus labelled at one of its ends by a modified ribonucleotide as defined above, with chemical agents making it possible to perform differential cleavages within this DNA at certain bases, notably those which have been described by MAXAM & GILBERT in the article already mentioned above, collecting and separating the DNA fragments in a system enabling them to be sorted in order of size, and reacting them with reagents permit-

ting the implementation of a coupling of the chemical groups borne by the terminal ribonucleotides of those of the fragments which bear them with a molecule or a product having a selective affinity with respect to the chemical modification group of said terminal ribonucleotides.

The modified ribonucleotides fixed at the end of the concerned DNAs are derived mainly

- from adenosine-5'-triphosphoric acid (ATP),
- from guanosine-5'-triphosphoric acid (GTP),
- from cytidine-5'-triphosphoric acid (CTP) and
- from uridine-5'-triphosphoric acid (UTP),

The chemical group bound covalently to these ribonucleotides can cover the most diverse forms, since it possesses a group permitting its coupling with related substances which enable it to be disclosed, preferably in directly visualizable form, and it does not prevent a DNA terminal transferase from ensuring the fixation of the modified ribonucleotides obtained at the ends of a DNA.

Among the preferred chemical groups capable of being fixed on the bases of said ribonucleotides, one may mention any group capable of being recognized specifically by another molecule or by a product, itself easily detectable, preferably by a visualization method.

This other molecule or this other product consists, for example, of an enzyme whose presence can be disclosed by the action that it is capable of exerting on a substrate, preferably a substrate giving rise to coloration or discoloration reactions, or else more generally a modification of absorption spectra detectable by colorimetry or spectrophotometry. Naturally, one can have recourse to molecules or products giving rise to fluorescence reactions, modifications of optical density, etc., e.g., products comprising groups derived from aminofluorene, dansyl chloride, rhodamine, etc.

Among the appropriate modification groups one may mention the chemical groups whose affinity for another type of chemical

molecule is known. Among these chemical modification groups one may mention biotin or avidin, whose reciprocal affinities are known, the groups derived from one of these molecules being able to serve for the modification of the chosen ribonucleotide and the other being able to be coupled with a reagent labelled by an enzyme or capable of being fixed to an enzyme, e.g., under the conditions described in patent No. 78 10975 of the PASTEUR INSTITUTE, filed on 13 April 1978. This reagent consists, for example, of a specific antibody directed against the modification group or of a molecule having a specific affinity for said modification group.

The usable modification groups of the initial ribonucleotide also include antigens or haptens able to be recognized by previously formed antibodies against these antigens or against these haptens, more particularly when the latter have been fixed in advance on a support macromolecule, such as a serum albumin or a polypeptide, e.g., a polylysine. Among these antigens or haptens one may cite biotin and avidin themselves, acetylaminofluorene groups, peptides, hormones or prostaglandins, notably those to which correspond specific antiserums or antibodies, lectins, whose capacity to be coupled to enzymes permitting their disclosure is known, notably peroxydases, β -galactosidases, etc. Such serums or antibodies are available commercially.

But the molecule or the product presenting characteristics of affinity with respect to the aforesaid modification group may also serve only as a relay with respect to another molecule or another product able to be visualized in turn, notably under the above-indicated conditions. For example, the product presenting the characteristics of affinity with respect to the aforesaid modification group is composed of an antibody which is itself not labelled, but recognizable in turn by antibodies against itself, these latter antibodies themselves being coupled to the enzyme capable of acting on a specific substrate under the standard conditions of enzyme immunoassay.

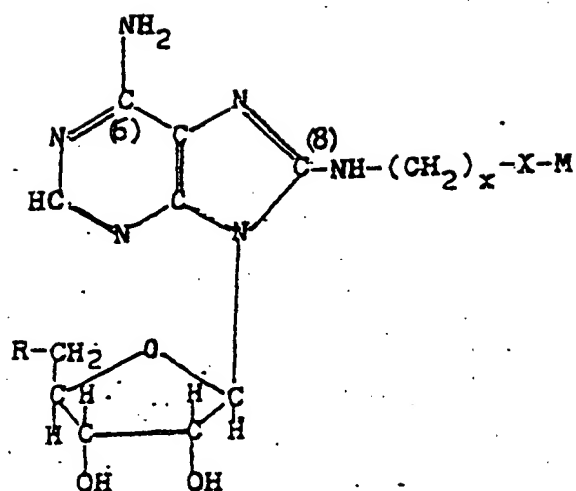
In general, the modification group of the ribonucleotide is composed of any molecule or chemical product that can be fixed on a ribonucleotide and then detected under the conditions which have been indicated, insofar as it does not interfere with the capacity of the obtained modified nucleotide to be attached to the end of a DNA under the action of a DNA terminal transferase.

This property is also the basis of the recognition test which makes it possible to confirm the reality thereof, i.e., the actual visualization, notably under the above-indicated conditions, of a determined DNA fragment bearing at at least one of its ends the ribonucleotide modified by the molecule or product under study, insofar as such a transformed DNA will have been formed as a result of the reaction of the corresponding DNA fragment with the modified ribonucleotide in the presence of a DNA terminal transferase under conditions normally permitting the fixation of the same ribonucleotide in unmodified form or of an oligomer of such ribonucleotides at at least one of the ends of this DNA fragment.

When the initial ribonucleotide consists of ATP, the above-indicated chemical modification group is fixed at the 6 position, or preferably the 8 position, of the adenine group.

This fixation occurs advantageously through the intermediary of an arm of the type $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_x\text{-X}$ or $\text{-CO-(CH}_2\text{)}_x\text{-X}$, wherein x varies from 2 to 20, notably from 6 to 12, and X is a group ensuring the bonding between an M group chosen from among those that are capable of a bonding reaction with a chemical or immunological agent having a selective affinity for this group. The CH_2 groups of the aforesaid arm can be partially replaced by CO or NH groups, provided of course that these replacement groups are not adjacent to identical groups.

For example, if one considers the case of the modification of the adenine group of ATP in its 8 position, the modified ribonucleotide obtained can be represented by the formula (case of an arm of the type $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_x\text{-X}$):



wherein R is a triphosphate group and x, X and M have the meanings indicated above. Advantageously, the X group consists of an NH or CO group.

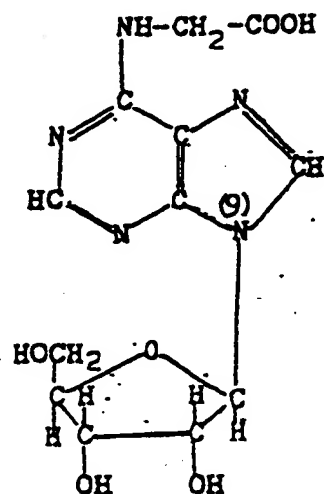
A process for fabricating the derivative of formula I, e.g., from ATP previously brominated in the 8 position, consists of reacting it under appropriate conditions with a compound of formula $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_x-\text{X}-\text{Y}$, wherein Y represents a radical to which will then be substituted the aforesaid M group, notably by implementing a condensation reaction with a molecule MZ, in the course of which the condensation product of formula I is then formed with liberation of a molecule Y-Z.

When the X group is NH, Y is advantageously hydrogen. When X is CO, Y is advantageously a hydroxyl. Z can consist of any group capable of being detached from M in the aforesaid condensation reaction, e.g., fluorine when the donor chemical molecule of the sought group is fluoro-1-dinitro-2,4-benzene, or a hydroxyl or hydrogen in the case of a peptide. In the latter case, the fixation of this peptide to the end of the aforesaid arm can, when the XY group consists of an NH_2 or COOH group, be effected by the implementation of coupling reactions, as are traditional in the chemistry of proteins, between carboxyl and amine groups, borne respectively by the two distinct peptide elements to be

coupled, e.g., by condensation in the presence of a condensation agent such as dicyclohexylcarbodiimide or after prior formation of an activated ester at the carboxyl function of that one of these two peptide elements which bears it.

The 8 position on the adenine cycle of ATP is obviously not the only point at which there can be branched a chain bearing a modification group such as defined above. By way of example, one of the hydrogen atoms borne by the carbon at the 6 position of the adenine cycle can be substituted by a chain bearing that group. By way of example, one may mention the substitution possibility which consists of reacting iodoacetic acid or an equivalent iodized organic acid with the ATP, permitting the prior formation of a quaternary salt, involving the nitrogen at the 1 position, a salt which is then transformed by heating to 35°C in a basic medium at a slightly basic pH, notably at pH 8, for a sufficient time, e.g., 72 hours, into a substitution product of one of the hydrogens of the NH₂ group fixed on the carbon at the 6 position of the adenine group (a reaction of the type known by the expression "Dimroth rearrangement").

One then obtains (when the iodized organic acid consists of iodoacetic acid) the compound of formula II below:



(II)

This compound can then be transformed, by reaction with the compound of formula $H_2N-(CH_2)_x-X-Y$ already defined above, under conditions permitting chemical bonding between the carbonyl group initially contained in the carboxyl group in the compound of formula II and the imino group initially belonging to the aminated function of the compound $H_2N-(CH_2)_x-X-Y$, which can then be coupled in turn with a compound of formula MZ under the conditions that have already been defined above.

It goes without saying that all the preceding elements aim only to illustrate particular preparation modes which make it possible to fix on the ATP a modification group chosen from among those to which related molecules correspond, as has been defined above.

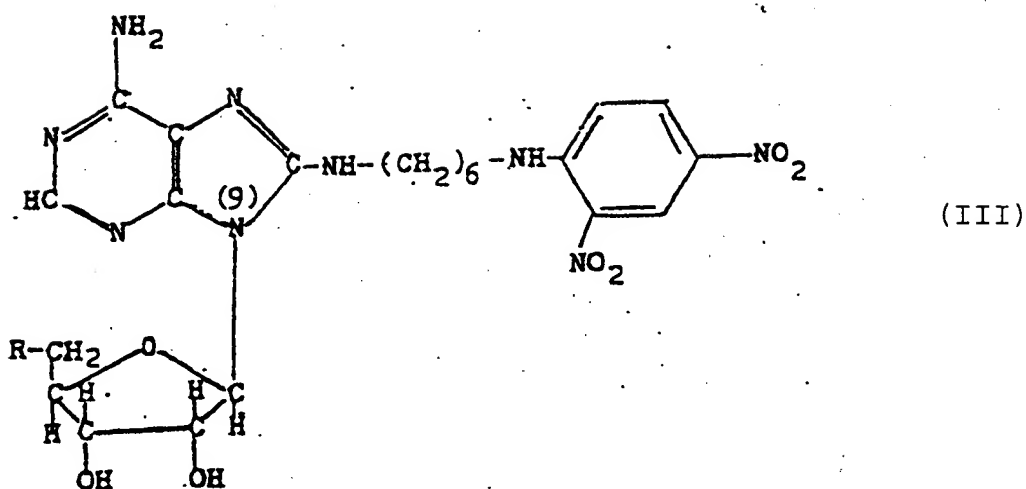
In an analogous manner, one can fabricate derivatives of GTP. the above-defined chemical modification groups then being fixed under analogous conditions at the 2 position or preferably the 8 position of the guanine group of GTP. The same reaction mechanisms are normally applicable.

Likewise, in the preferred applications which have been indicated, one can use UTP or CTP modified by a chemical group meeting the above-indicated conditions, but having recourse to the entirely different process described in the article by P.R. LANGER at al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 78, No. 11, pp. 6633-6637, November 1981).

Other characteristics of the invention will appear in the description of preferred exemplary embodiments of the invention.

Preparation of 8-[-N-(dinitrophenyl)aminohexyl]-aminoadenosine-5'-triphosphate

One reacts 8-(aminohexyl)aminoadenosine-5'-triphosphate with fluoro-1-dinitro-2,4-benzene in a water-ethanol mixture, 10/1 volume-%, at pH 8.8, at 40°C, and in the presence of a salt, notably magnesium chloride. The reaction product finally obtained has the formula:

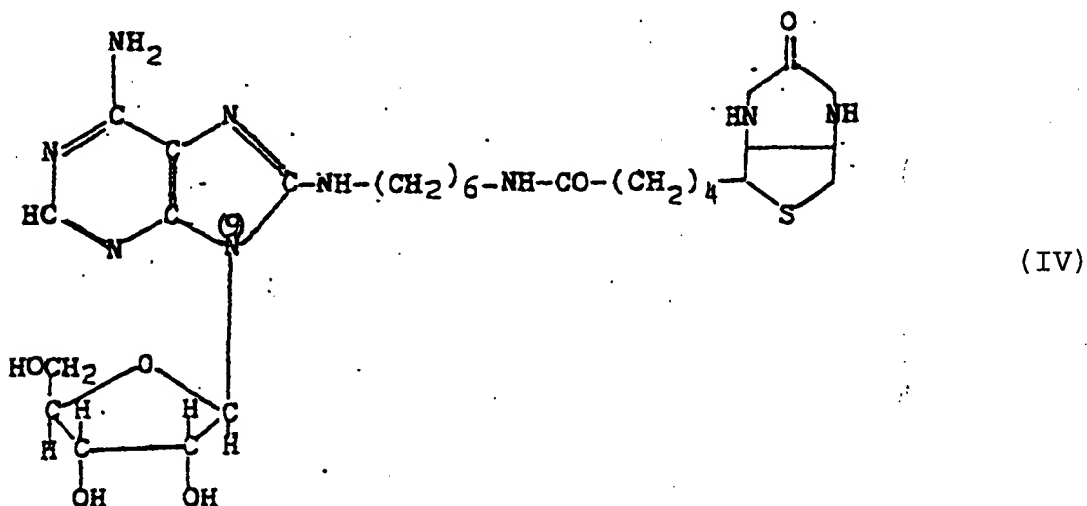


One recovers the derivative of formula III, hereinafter called ATP-DNP, after a purification comprising the fixation of the ribonucleotide on DEAE cellulose, elution with a gradient of LiCl 0.2 N, pH 5.5 to LiCl 0.5 N, pH 2 and filtration on molecular sieve of the SEPHADEX G50 type. The reaction yield is 52%. The collected fractions are analyzed by absorption spectrophotometry and with radiation of wavelengths of 280 and 360 nanometers, respectively. One collects the fraction whose optical densities in the two aforesaid wavelength ranges are in a ratio (OD_{280}/OD_{360}) equal to 4. The product contained in this fraction corresponds to that resulting from the fixation of 1 mole of DNP on 1 mole of ATP. It also gives only one spot in a thin-layer chromatography system. The product of this fraction is lyophilized.

This product presents the characteristic of being recognized by antibodies formed in advance with respect to dinitro-2,4-benzene, which had previously been fixed on a macromolecular support of the serum albumin type. Antibodies of this type are also available commercially.

Preparation of 8-(N-biotinylaminohexyl)aminoadenosine-5'-triphosphate

One condenses 8-(aminohexyl)aminoadenosine-5'-triphosphate with biotinyl-N-hydroxysuccinimide ester under the conditions described by LANGER et al., as applied to the fabrication of biotinyl-UTP from 5-(3-amino)allyluridine. One then obtains the compound of formula:



Fabrication of a DNA labelled at its ends by modified ribonucleotides

600 micromoles of ATP-DNP and 10 micrograms of a DNA fragment comprising 500 base pairs are reacted in the presence of 30 units of DNA terminal transferase at 37°C for 24 hours in a buffer solution whose composition is as follows (final volume 200 microliters):

potassium cacodylate	: 100 mM
bovine serum albumin	: 1 mg/ml
dithiothreitol	: 1 mM
cobalt chloride	: 1 mM

The DNA with ATP-DNP groups at its ends is purified by passing the solution through a column of the molecular sieve marketed under the tradename SEPHADEX G 50.

One drop of this fraction is deposited onto a cellulose filter. After drying the filter, one puts it into contact with a solution of rabbit anti-DNP antibody. The nonfixed antibody is rinsed. The filter is then put into contact with a solution of rabbit antibody bound to peroxidase. After rinsing the nonfixed excess antibody, one discloses the presence of antibodies fixed on the filter with a solution of a substrate for the peroxidase.

This solution contains:

- oxygenated water: 10 μ l of H_2O_2 to 110 volumes
- potassium acetate: 9.5 ml, 0.05 M, pH 5.1
- carbazole: 2 mg for 0.5 ml of N-N'-dimethylformamide.

The presence of the rabbit anti-antibody on the filtrate is then disclosed by the formation of a brownish red precipitate.

The sensitivity of the method is such that it enables one to detect extremely small quantities of DNA, notably $380 \cdot 10^{-4}$ picomoles.

Application of the modified DNAs according to the invention to the analysis of the deoxynucleotide sequences which comprise them

The first steps of the method permitting analysis of the nucleotide sequences contained in the interior of a determined double-stranded DNA are shown schematically below:

The DNA thus modified is subjected to an alkaline hydrolysis in a 1 M soda solution at 40°C by means of which one obtains a modified DNA which is again recoverable by filtration through a molecular sieve and which now bears only a single modified ribonucleotide at each of its terminal ends (3).

By action of a restriction enzyme, e.g., under the conditions described by MAXAM & GILBERT, one produces two fragments denoted by A and B at (4). Note that one can obviously modify at will the order of the operations (2), (3) and (4).

After isolation and purification of the B fragments, for example, they are distributed into several lots which are subjected to different differential cleavage reactions such as those described by MAXAM & GILBERT and under the conditions described by them. The products resulting from these selective cleavage reactions are subjected to acrylamide gel electrophoresis operations under the conditions described by the same authors in order to separate the different DNA fragments, labelled respectively at their ends in order of size, and in different bands.

According to the invention, one then proceeds to disclose the different labelled fragments, e.g., *in situ* in the gel, by putting them into contact with the antibody solutions under the conditions that have been indicated above. One can also at least partially transfer the distinct migration bands onto a cellulose filter or similar support by applying this filter onto the gel, the different fragments of bands then being detected on the filter itself, e.g., under the conditions that have already been indicated above.

One will appreciate that this extremely sensitive method no longer involves the previously necessary use of extremely thin gel plates, since the detection can now be accomplished by direct visualization of the fractionation bands either in the gel or on the filter.

Of course, the invention concerns the modified ribonucleotides themselves when they are novel. That is the case, in particular,

for the ribonucleotides modified under the above-indicated conditions when they are derived from ATP.

As goes without saying and also already follows from the preceding, the invention is in no way limited to those of its modes of application and implementation that have been specially described; on the contrary, it covers all their variants.

CLAIMS

1 - DNA modified by an oligomer of modified ribonucleotides, preferably a single modified ribonucleotide, fixed at at least one of its ends, the modification of the ribonucleotide itself consisting of a chemical molecule fixed covalently to this ribonucleotide and bearing at least one group not engaged in the aforesaid covalent bond and capable of being coupled directly or indirectly with a molecule or a product having a specific affinity for this group and permitting its recognition, said group further being such that it does not prevent a ribonucleotide which bears it from being fixed at the end of a DNA in the presence of a DNA terminal transferase when it is put into contact with this DNA under conditions permitting the fixation of one or more ribonucleotides on that end.

2 - Modified DNA according to claim 1, characterized in that said modification group is capable of being recognized specifically and directly by another molecule or by a product, itself easily detectable, by a visualization method.

3 - Modified DNA according to claim 2, characterized in that said modification group consists of an antigen or a hapten able to be recognized by a previously formed antibody against this antigen or against this hapten.

4 - Modified DNA according to claim 1, characterized in that said modification group serves as a relay with respect to another molecule or another product able to be visualized in turn.

5 - Modified DNA according to any of claims 1 to 4, characterized in that said modification group or, depending on the case, said relay molecule, can be coupled chemically with a related molecule labelled by an enzyme or immunologically with an antibody labelled by an enzyme and having a selective affinity for said modification group or said relay molecule.

6 - Modified DNA according to any of claims 1 to 5, characterized by the fixation at at least one of its ends of at least one modified ribonucleotide group, derived from ATP modified by a modification group fixed covalently at the 6 position, or preferably at the 8 position, of its adenine group through the intermediary of an arm of the type $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_x\text{-X}$ or $\text{-CO-(CH}_2\text{)}_x\text{-X}$, wherein x varies from 2 to 20, notably from 6 to 12, and X is a group ensuring the bonding between an M group chosen from among those that are capable of a bonding reaction with a chemical or immunological agent having a selective affinity for this group.

7 - Modified DNA according to claim 6, characterized in that the CH_2 groups of the aforesaid arm can be partially replaced by CO or NH groups, provided of course that these replacement groups are not adjacent to identical groups.

8 - Modified DNA according to any of claims 1 to 7, characterized in that said modification group comprises a group derived from biotin, from avidin or a dinitro-2,4-phenyl group.

9 - Process for modification of a DNA comprising the steps consisting of treating said DNA with a ribonucleotide bearing a modification group such as defined in any of claims 1 to 8 in the presence of at least that one of the ribonucleotides normally capable of being paired in a DNA with the ribonucleotide in question, whether or not it bears such a modification group, and of a DNA terminal transferase, then if necessary, and when the product of fixation at the end of the DNA resulting from this treatment consists of an oligomer of modified nucleotides, of eliminating the modified ribonucleotides from this possible oligomer, except for the ribonucleotide directly fixed to the terminal deoxyribonucleotide at the end of the DNA in question,

preferably by the action of an alkaline base, notably soda [sodium carbonate], under conditions permitting separation of the bonds which the ribonucleotides form between one another in this oligomer fragment.

10 - Application of the modification of the DNA at one of its ends by a ribonucleotide bearing a modification group such as defined in any of claims 1 to 8 to the obtaining of a restriction map of this DNA by action of corresponding restriction enzymes, and by recovery, sorting and comparing the sizes of the fragments obtained and all bearing the same modified ribonucleotide at one of their ends.

11 - Application of the modification of the DNA at one of its ends by a ribonucleotide bearing a modification group such as defined in any of claims 1 to 8 to the implementation of an analysis of the sequence of nucleotides of which this DNA is composed, by a process comprising the steps which consist of treating this DNA with chemical agents making it possible to perform differential cleavages within this DNA at certain bases, collecting and separating the DNA fragments in a system enabling them to be sorted in order of size, and reacting them with reagents permitting the implementation of a coupling of the chemical groups borne by the terminal ribonucleotides of those of the fragments which bear them with a molecule or a product having a selective affinity with respect to the chemical modification group of said terminal ribonucleotides, for the purpose of visualizing them, and determining the unmodified terminal nucleotides of each of these DNA fragments, due allowance being made for the nature of the chemical agent used for the cleavage at its site.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR82/00223

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ¹ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC IPC ³ : C07H 21/00; C12N 15/00; G01N 33/50																	
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: right; font-size: small;">Minimum Documentation Searched ⁴</div> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 30%; border: none; vertical-align: top;"> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 30%; text-align: left; padding: 2px;">Classification System</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">IPC³</td> <td style="padding: 5px;">C07H 21/00; C12N 15/00</td> </tr> </table> </td> <td style="border: none;"></td> </tr> </table> <div style="text-align: center; font-size: x-small; margin-top: 5px;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁴</div>			<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 30%; text-align: left; padding: 2px;">Classification System</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">IPC³</td> <td style="padding: 5px;">C07H 21/00; C12N 15/00</td> </tr> </table>	Classification System	Classification Symbols	IPC ³	C07H 21/00; C12N 15/00										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 30%; text-align: left; padding: 2px;">Classification System</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">IPC³</td> <td style="padding: 5px;">C07H 21/00; C12N 15/00</td> </tr> </table>	Classification System	Classification Symbols	IPC ³	C07H 21/00; C12N 15/00													
Classification System	Classification Symbols																
IPC ³	C07H 21/00; C12N 15/00																
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%; text-align: left; padding: 2px;">Category [*]</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of Document, ¹⁵ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷</th> <th style="width: 10%; text-align: left; padding: 2px;">Relevant to Claim No. ¹⁸</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">Chemical Abstracts, vol. 96, No. 7, February 15, 1982 (Columbus, Ohio, US), P.R. Langer et al.: "Enzymic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes", see page 207, column 2, ref.: 47771z, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1981, 78(11), 6633-7</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-11</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">DE, A, 2618511 (MILES), 04 November 1976, see pages 34-119</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">DE, A, 2618419 (MILES), 04 November 1976, see pages 34-62</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">US, A, 4255556 (R.J. CARRICO et al.), 10 March 1981, see column 2, lines 50-70; columns 3, 4</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1</td> </tr> </tbody> </table>			Category [*]	Citation of Document, ¹⁵ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸	X	Chemical Abstracts, vol. 96, No. 7, February 15, 1982 (Columbus, Ohio, US), P.R. Langer et al.: "Enzymic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes", see page 207, column 2, ref.: 47771z, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1981, 78(11), 6633-7	1-11	Y	DE, A, 2618511 (MILES), 04 November 1976, see pages 34-119	1	Y	DE, A, 2618419 (MILES), 04 November 1976, see pages 34-62	1	Y	US, A, 4255556 (R.J. CARRICO et al.), 10 March 1981, see column 2, lines 50-70; columns 3, 4	1
Category [*]	Citation of Document, ¹⁵ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸															
X	Chemical Abstracts, vol. 96, No. 7, February 15, 1982 (Columbus, Ohio, US), P.R. Langer et al.: "Enzymic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes", see page 207, column 2, ref.: 47771z, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1981, 78(11), 6633-7	1-11															
Y	DE, A, 2618511 (MILES), 04 November 1976, see pages 34-119	1															
Y	DE, A, 2618419 (MILES), 04 November 1976, see pages 34-62	1															
Y	US, A, 4255556 (R.J. CARRICO et al.), 10 March 1981, see column 2, lines 50-70; columns 3, 4	1															
<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: x-small;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁵</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p> </div> </div>																	
IV. CERTIFICATION <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Date of the Actual Completion of the International Search ¹</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">16 March 1983 (16.03.83)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">International Searching Authority ¹</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">European Patent Office</td> </tr> </table> </td> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Date of Mailing of this International Search Report ¹</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">31 March 1983 (31.03.83)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Signature of Authorized Officer ¹⁹</td> </tr> <tr> <td style="height: 40px;"></td> </tr> </table> </td> </tr> </table>			<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Date of the Actual Completion of the International Search ¹</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">16 March 1983 (16.03.83)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">International Searching Authority ¹</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">European Patent Office</td> </tr> </table>	Date of the Actual Completion of the International Search ¹	16 March 1983 (16.03.83)	International Searching Authority ¹	European Patent Office	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Date of Mailing of this International Search Report ¹</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">31 March 1983 (31.03.83)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Signature of Authorized Officer ¹⁹</td> </tr> <tr> <td style="height: 40px;"></td> </tr> </table>	Date of Mailing of this International Search Report ¹	31 March 1983 (31.03.83)	Signature of Authorized Officer ¹⁹						
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Date of the Actual Completion of the International Search ¹</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">16 March 1983 (16.03.83)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">International Searching Authority ¹</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">European Patent Office</td> </tr> </table>	Date of the Actual Completion of the International Search ¹	16 March 1983 (16.03.83)	International Searching Authority ¹	European Patent Office	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Date of Mailing of this International Search Report ¹</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">31 March 1983 (31.03.83)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Signature of Authorized Officer ¹⁹</td> </tr> <tr> <td style="height: 40px;"></td> </tr> </table>	Date of Mailing of this International Search Report ¹	31 March 1983 (31.03.83)	Signature of Authorized Officer ¹⁹									
Date of the Actual Completion of the International Search ¹																	
16 March 1983 (16.03.83)																	
International Searching Authority ¹																	
European Patent Office																	
Date of Mailing of this International Search Report ¹																	
31 March 1983 (31.03.83)																	
Signature of Authorized Officer ¹⁹																	



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ³ : C07H 21/00; C12N 15/00 G01N 33/50	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 83/ 02277 (43) Date de publication internationale: 7 juillet 1983 (07.07.83)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR82/00223 (22) Date de dépôt international: 29 décembre 1982 (29.12.82) (31) Numéro de la demande prioritaire: 81/24443 (32) Date de priorité: 29 décembre 1981 (29.12.81) (33) Pays de priorité: FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur Roux, F-75015 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : KOURILSKY, Philippe [FR/FR]; 207, rue de Vaugirard, F-75015 Paris (FR). VINCENT, Christian [FR/FR]; 24, rue du Hambeau, F-75015 Paris (FR). TCHEN, Paul [FR/FR]; 18, rue du Télégraphe, F-92000 Nanterre (FR).		(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Cabinet Plasse- raud, 84, rue d'Amsterdam, F-75009 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet euro- péen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), GB (brevet européen), JP, NL (brevet européen), US. Publiée Avec rapport de recherche internationale.
(54) Title: DNA FRAGMENTS MARKED AT LEAST AT ONE OF THE ENDS THEREOF BY MODIFIED RIBO- NUCLEOTIDES RECOGNIZABLE BY RELATED MOLECULES AND METHOD FOR ANALYZING SUCH DNA FRAGMENTS		
(54) Titre: FRAGMENT D'ADN MARQUES A L'UNE AU MOINS DE LEURS EXTREMITES PAR DES RIBONU- CLEOTIDES MODIFIES RECONNAISSABLES PAR DES MOLECULES AFFINES ET PROCEDE POUR REALISER UNE ANALYSE DE TELS FRAGMENT D'ADN		
(57) Abstract <p>Method for analyzing DNA sequences. It comprises the fixing at one of the ends of such DNA a ribonucleotide carrying a molecule covalently fixed and carrying a modification group which may be coupled with an enzyme, allowing a further visualization thereof in presence of a terminal DNA transferase, treating said DNA with different chemical agents allowing to operate differential cleavages within such DNA at the basis, which are also of respectively distinct natures, collecting and separating the DNA fragments carrying the visualizable groups in a system allowing to sort them by the size, and determining the unmodified terminal nucleotides of said DNA fragments, considering the nature of the chemical agents used for the cleavage at their respective levels.</p>		
(57) Abrégé <p>Procédé d'analyse de séquences d'un ADN. Il consiste à fixer à l'une des extrémités de cet ADN un ribonucléotide portant une molécule fixée de façon covalente et portant un groupe de modification couplable avec une enzyme, permettant leur visualisation ultérieure en présence d'un ADN terminal transférase, à traiter cet ADN avec des agents chimiques distincts permettant d'opérer des clivages différentiels au sein de cet ADN au niveau de bases, également de natures respectivement distinctes, à recueillir et à séparer les fragments d'ADN portant les groupes visualisables dans un système permettant de les trier par ordre de tailles, et à déterminer les nucléotides terminaux non modifiés de ces fragments d'ADN, eu égard à la nature des agents chimiques utilisés pour le clivage à leurs niveaux respectifs.</p>		

Fragments d'ADN marqués à l'une au moins de leurs extrémités par des ribonucléotides modifiés reconnaissables par des molécules affines et procédé pour réaliser une analyse de tels fragments d'ADN.

L'invention est relative à des fragments d'ADN marqués à l'une au moins de leurs extrémités par des fragments de nucléotides modifiés, plus particulièrement de ribonucléotides modifiés reconnaissables par des molécules affines, et à un procédé pour réaliser une analyse de séquence de tels fragments.

Parmi les techniques d'analyse des séquences de nucléotides contenues dans un ADN, on mentionnera à titre principal la méthode dite de MAXAM & GILBERT (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 74, N° 2, pp. 560-564, février 1977), méthode qui consiste à soumettre l'ADN à analyser, à des réactions de clivages différentiels au niveau des bases guanine et adénine, à des clivages à proportions égales au niveau des bases cytosine et thymine et enfin à des clivages au niveau des seules bases cytosine. Cette méthode implique cependant que l'ADN étudié ait auparavant été marqué à l'une de ses extrémités par un marqueur radioactif, notamment le ^{32}P , d'où la possibilité, après séparation des fragments obtenus après les susdites opérations de clivage, notamment par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide, de reconstituer la séquence d'enchaînement des différents nucléotides dont était initialement constitué l'ADN étudié, plus particulièrement à partir des images autoradiographiques qui peuvent être formées sur un film impressionnable appliqué sur le gel.

Les difficultés qu'implique la révélation autoradiographique des produits des clivages sur la plaque de gel sont bien connues. En raison de la diffusion du rayon-

nement des isotopes marqués dans toutes les directions de l'espace, une résolution satisfaisante des différentes bandes de migration dans le gel suppose l'utilisation de plaques extrêmement minces. En général, l'épaisseur de ces plaques ne dépasse pas 0,3 mm d'épaisseur. L'utilisation de plaques de gel plus épaisses entraînerait une diminution rapide du pouvoir de résolution du procédé autoradiographique. L'utilisation de la radioactivité en elle-même n'est pas non plus sans dangers.

10 L'invention a pour but de remédier à ces difficultés, notamment de fournir un procédé de modification des ADN dont la séquence doit être étudiée, rendant plus aisée la détection ultérieure des fragments d'ADN susceptibles d'être obtenus par un procédé d'analyse de séquences
15 (tel qu'il a été rappelé plus haut, ou par tout autre procédé susceptible de conduire à des résultats analogues).

L'ADN modifié selon l'invention est caractérisé par le fait qu'un oligomère de ribonucléotides modifiés, de préférence un ribonucléotide modifié unique, est fixé
20 à l'une au moins de ses extrémités, la modification du ribonucléotide lui-même consistant en une molécule chimique fixée de façon covalente à ce ribonucléotide et portant au moins un groupe non engagé dans la liaison covalente susdite et couplable directement ou indirectement avec une
25 molécule ou un produit ayant une affinité spécifique pour ce groupe et permettant par conséquent la reconnaissance sélective de l'ADN modifié.

En particulier, ce groupe permet une liaison affine chimique ou immunologique avec une molécule ou un
30 produit lui-même directement révélabile ou susceptible d'être révélé à son tour par couplage avec un autre produit révélateur. En outre, ce groupe est tel qu'il ne modifie pas la capacité de ce ribonucléotide à être fixé à l'extrémité d'un ADN, en présence d'une ADN-transférase
35 terminale, lorsqu'il est mis en contact avec cet ADN, dans des conditions permettant la fixation d'un ou de plusieurs ribonucléotides sur cette extrémité.

L'invention concerne également un procédé pour

obtenir un tel ADN modifié, ce procédé consistant à traiter l'ADN à étudier avec un tel ribonucléotide modifié, en présence d'au moins celui des ribonucléotides normalement susceptible de s'apparier dans un ADN avec le ribonucléotide en question, porteur ou non d'un tel groupe de modification, et d'une ADN-terminale transférase, le cas échéant, et lorsque le produit de fixation à l'extrémité de l'ADN résultant de ce traitement consiste en un oligomère de nucléotides modifiés, à éliminer les ribonucléotides modifiés de cet éventuel oligomère, à l'exception du ribonucléotide directement fixé au déoxyribonucléotide terminal d'extrémité de l'ADN en question. Cette élimination est de préférence faite au moyen d'une base alcaline, notamment de la soude, dans des conditions permettant la séparation des liaisons que forment entre eux les ribonucléotides dans ce fragment d'oligomère.

On peut obtenir de façon en soi connue, à partir d'un ADN portant à ses deux extrémités des ribonucléotides eux-mêmes modifiés, comme défini ci-dessus (ou à partir d'un ADN n'en portant qu'à l'une de ses extrémités), des fragments d'ADN plus petits, soit par action d'agents chimiques susceptibles de provoquer des clivages, notamment au niveau de nucléotides déterminés, soit, de préférence, par action d'endonucléases, notamment d'enzymes de restriction appropriées, dans la mesure où l'ADN correspondant comporte le site de restriction correspondant.

Le traitement de ce fragment d'ADN avec plusieurs enzymes de restriction permet, par récupération des différents fragments marqués à la même extrémité, l'établissement éventuel d'une carte de restriction de cet ADN.

Lorsqu'à une certaine enzyme de restriction correspond un site de restriction unique, le traitement dudit fragment d'ADN par cette enzyme permet l'obtention de fragments de longueur déterminée, se prêtant à une analyse de la séquence des déoxyribonucléotides dont ils sont formés.

En effet, l'invention concerne aussi, dans l'une de ses applications préférées, un procédé comprenant les étapes qui consistent à traiter un ADN ainsi marqué à l'une

de ses extrémités par un ribonucléotide modifié comme ci-dessus défini, avec des agents chimiques permettant d'opérer au sein de cet ADN des clivages différentiels au niveau de certaines bases, notamment celles qui ont
5 été décrites par MAXAM & GILBERT dans l'article déjà mentionné plus haut, à recueillir et à séparer des fragments d'ADN dans un système permettant de les trier par ordre de tailles, et à les faire réagir avec des réactifs permettant la réalisation d'un couplage des
10 groupes chimiques portés par les ribonucléotides terminaux de ceux des fragments qui en portent, avec une molécule ou un produit ayant une affinité sélective à l'égard du groupe chimique de modification desdits ribonucléotides terminaux.

15 Les ribonucléotides modifiés fixés à l'extrémité des ADN concernés sont principalement dérivés :
- de l'acide adénosine 5'-triphosphorique (ATP),
- de l'acide guanosine 5'-triphosphorique (GTP),
- de l'acide cytidine 5'-triphosphorique (CTP) et
20 - de l'acide uridine 5'-triphosphorique (UTP).

Le groupe chimique lié de façon covalente à ces ribonucléotides peut revêtir les formes les plus diverses, dès lors qu'il possède un groupe permettant son couplage avec des substances affines permettant sa
25 révélation, de préférence sous forme directement visualisable, et qu'il n'empêche pas une ADN-transférase terminale d'assurer la fixation des ribonucléotides modifiés obtenus aux extrémités d'un ADN.

Parmi les groupes chimiques préférés susceptibles d'être fixés sur les bases des susdits ribonucléotides, on mentionnera tout groupe susceptible
30 d'être reconnu spécifiquement par une autre molécule ou par un produit, lui-même aisément détectable, de préférence par une méthode de visualisation.

35 Cette autre molécule ou cet autre produit consiste par exemple en une enzyme, dont la présence peut être révélée par l'action qu'elle est susceptible d'exercer sur un substrat, de préférence un substrat

donnant lieu à des réactions de coloration ou de décoloration, ou plus généralement encore de modification de spectres d'absorption respectivement décelables par colorimétrie ou spectrophotométrie. On peut naturellement

5 avoir recours à des molécules ou produits donnant lieu à des réactions de fluorescence, à des modifications de densité optique, etc., par exemple des produits comprenant des groupes dérivés de l'aminofluorène, du chlorure de dansyle, de la rhodamine, etc..

10 Parmi les groupes de modification appropriés, on mentionnera les groupes chimiques dont est connue l'affinité pour un autre type de molécule chimique. Parmi ces groupes de modification chimique, on peut mentionner la biotine ou l'avidine, dont on connaît les affinités réciproques, les groupes dérivés de l'une de ces molécules
15 pouvant servir à la modification du ribonucléotide choisi et l'autre de molécule couplable avec un réactif marqué par une enzyme ou susceptible d'être fixée à une enzyme, par exemple dans les conditions décrites dans le brevet
20 n° 78 10975 de l'INSTITUT PASTEUR déposé le 13 avril 1978. Ce réactif consiste par exemple en un anticorps spécifique dirigé contre le groupe de modification ou en une molécule ayant une affinité spécifique pour ledit groupe de modification.

25 Parmi les groupes de modification utiles du ribonucléotide initial, figurent également des antigènes ou haptènes susceptibles d'être reconnus par des anticorps préalablement formés contre ces antigènes ou contre ces haptènes, plus particulièrement lorsque ceux-ci ont été
30 fixés au préalable sur une macromolécule support, telle qu'une sérum-albumine ou un polypeptide, par exemple une polylysine. Parmi ces antigènes ou haptènes, on peut citer la biotine et l'avidine elles-mêmes, des groupes acétylaminofluorène, des peptides, hormones ou prostaglandines,
35 notamment ceux auxquels correspondent des antisérums ou anticorps spécifiques, des lectines, dont est connue la capacité à être couplées à des enzymes permettant leur révélation, notamment des peroxydases, β -galactosidases, etc... De tels sérums ou anticorps sont disponibles dans

le commerce.

Mais la molécule ou le produit présentant des caractéristiques d'affinité vis-à-vis du groupe de modification susdit, sert éventuellement aussi seulement de
5 relais vis-à-vis d'une autre molécule ou d'un autre produit susceptible d'être visualisé à son tour, notamment dans les conditions sus-indiquées ; par exemple le produit présentant les caractéristiques d'affinité, vis-à-vis du groupe de modification susdit, est constitué par
10 un anticorps lui-même non marqué, mais reconnaissable à son tour par des anticorps contre lui-même, ces derniers anticorps étant eux-mêmes couplés à l'enzyme susceptible d'agir sur un substrat spécifique, dans les conditions classiques en matière de dosage immunoenzymatique.

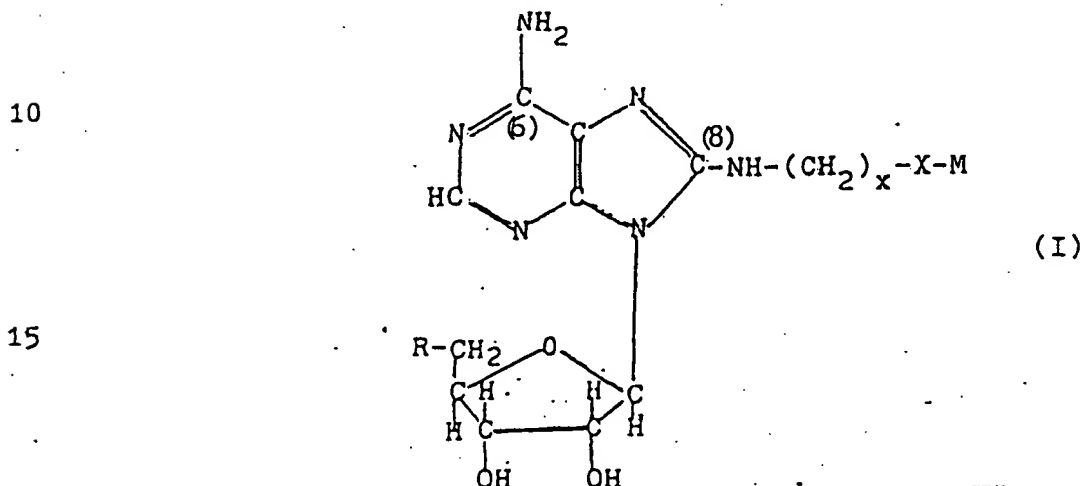
15 D'une façon générale, le groupe de modification du ribonucléotide est constitué par toute molécule ou produit chimique fixable sur un ribonucléotide et ensuite détectable dans les conditions qui ont été indiquées, dans la mesure où il ne perturbe pas la capacité du nuclé-
20 otide modifié obtenu à être attaché à l'extrémité d'un ADN, sous l'action d'une ADN-transférase terminale ; cette propriété est également à la base du test de reconnaissance qui permet d'en constater la réalité, savoir la visualisation effective, notamment dans les conditions.
25 sus-indiquées, d'un fragment d'ADN déterminé porteur à l'une au moins de ses extrémités du ribonucléotide modifié par la molécule ou produit étudié, dans la mesure où un tel ADN transformé aura été formé, à l'issue de la réaction du fragment d'ADN correspondant avec le ribonuclé-
30 otide modifié, en présence d'une ADN-transférase terminale dans des conditions permettant normalement la fixation du même ribonucléotide non modifié ou d'un oligomère de tels ribonucléotides, à l'une au moins des extrémités de ce fragment d'ADN.

35 Lorsque le ribonucléotide initial est constitué par l'ATP, le groupe de modification chimique sus-indiqué est fixé sur la position 6, de préférence 8, du groupe adénine.

Cette fixation intervient avantageusement par l'intermédiaire d'un bras du type $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_x\text{-X}$, ou $\text{-CO-(CH}_2\text{)}_x\text{-X}$, dans lequel x varie de 2 à 20, notamment de 6 à 12, et X est un groupe assurant la liaison entre 5 un groupe M, choisi parmi ceux qui sont susceptibles d'une réaction de liaison avec un agent chimique ou immunologique ayant une affinité sélective pour ce groupe. Les groupes CH_2 du bras susdit peuvent en partie être remplacés par des groupes CO ou NH, à condi-

tion naturellement que ces groupes de remplacement ne soient pas adjacents à des groupes identiques.

Par exemple, si l'on considère le cas de la modification du groupe adénine de l'ATP en sa position 8, le ribonucléotide modifié obtenu peut être représenté par la formule (cas d'un bras du type $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_x\text{-X-}$) :



20 dans laquelle R est un groupe triphosphate, x, X et M ont les significations sus-indiquées. Avantagemment, le groupe X est constitué par un groupe NH ou CO.

Un procédé pour fabriquer le dérivé de formule I, par exemple à partir de l'ATP préalablement bromé en position 8, consiste à le faire réagir dans les conditions appropriées, avec un composé de formule $\text{H}_2\text{N-(CH}_2\text{)}_x\text{-X-Y}$, dans lequel Y représente un radical auquel sera ensuite substitué le groupe M susdit, notamment par la mise en oeuvre d'une réaction de condensation avec une molécule MZ, au cours de laquelle est alors formé le produit de condensation de formule I, avec libération d'une molécule Y-Z.

30

Lorsque le groupe X est NH, Y est avantagemment de l'hydrogène. Lorsque X est CO, Y est avantagemment un hydroxyle. Z peut être constitué par tout groupe susceptible d'être détaché de M dans la susdite réaction de condensation, par exemple le fluor lorsque la molécule chimique donneuse du groupe recherché est le fluoro-1-dinitro-2,4 benzène, ou un hydroxyle

35

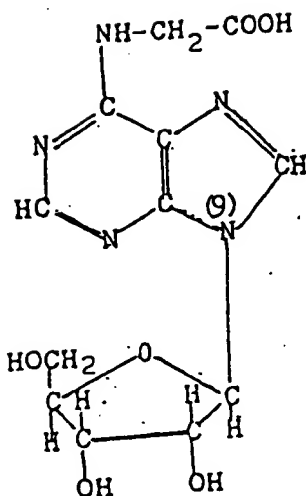
ou de l'hydrogène dans le cas d'un peptide. Dans ce dernier cas, la fixation de ce peptide à l'extrémité du bras susdit peut, lorsque le groupe XY est constitué par un groupe NH_2 ou COOH , être effectué par la mise en oeuvre de réactions de couplage, traditionnelles dans la chimie des protéines, entre groupes carboxyle et amine, respectivement portés par les deux éléments peptidiques distincts à coupler, par exemple par condensation en présence d'un agent de condensation, tel que le dicyclohexyl-carbodiimide ou après formation préalable d'un ester activé à la fonction carboxylique de celui de ces deux éléments peptidiques qui le portent.

La position 8 sur le cycle adénine de l'ATP ne constitue évidemment pas le seul point sur-lequel peut se brancher une chaîne porteuse d'un groupe de modification tel qu'il a été défini plus haut. A titre d'exemple, on peut également substituer l'un des atomes d'hydrogène porté par le carbone en position 6 du cycle adénine par une chaîne porteuse de ce groupe. A titre d'exemple, on mentionnera la possibilité de substitution qui consiste à faire réagir avec l'ATP de l'acide iodoacétique ou un acide organique iodé équivalent, permettant la formation préalable d'un sel quaternaire, faisant intervenir l'azote en position 1, sel qui se transforme ensuite par chauffage en milieu basique à 35°C , à pH légèrement basique, notamment à pH 8, pendant le temps suffisant, par exemple 72 heures, en un produit de substitution de l'un des hydrogènes du groupe NH_2 fixé sur le carbone en position 6 du groupe adénine (réaction du type connu sous l'expression "réarrangement de Dimroth").

On obtient alors (lorsque l'acide organique iodé est constitué par l'acide iodoacétique) le composé de formule II ci-après :

5

10



(II)

15 Ce composé peut ensuite être transformé, par
 réaction avec le composé de formule $H_2N-(CH_2)_x-X-Y$ déjà
 défini plus haut, dans des conditions permettant la
 liaison chimique entre le groupe carbonyle initialement
 contenu dans le groupe carboxyle dans le composé de
 formule II et le groupe imino appartenant initialement
 20 à la fonction aminée du composé $H_2N-(CH_2)_x-X-Y$, lequel
 peut alors être couplé à son tour avec un composé de
 formule MZ, dans les conditions qui ont déjà été défini-
 nies plus haut.

25 Il va de soi que tous les éléments qui pré-
 cèdent ne visent qu'à illustrer des modes de prépara-
 tion particuliers qui permettent de fixer sur l'ATP
 un groupe de modification choisi parmi ceux auxquels
 correspondent des molécules affines, comme cela a été
 défini plus haut.

30 On peut de façon analogue fabriquer des dé-
 rivés du GTP, les groupes de modification chimique sus-
 définis étant alors fixés dans des conditions ana-
 logues sur la position 2 ou de préférence 8 du groupe
 guanine du GTP. Les mêmes mécanismes de réaction sont
 35 normalement applicables.

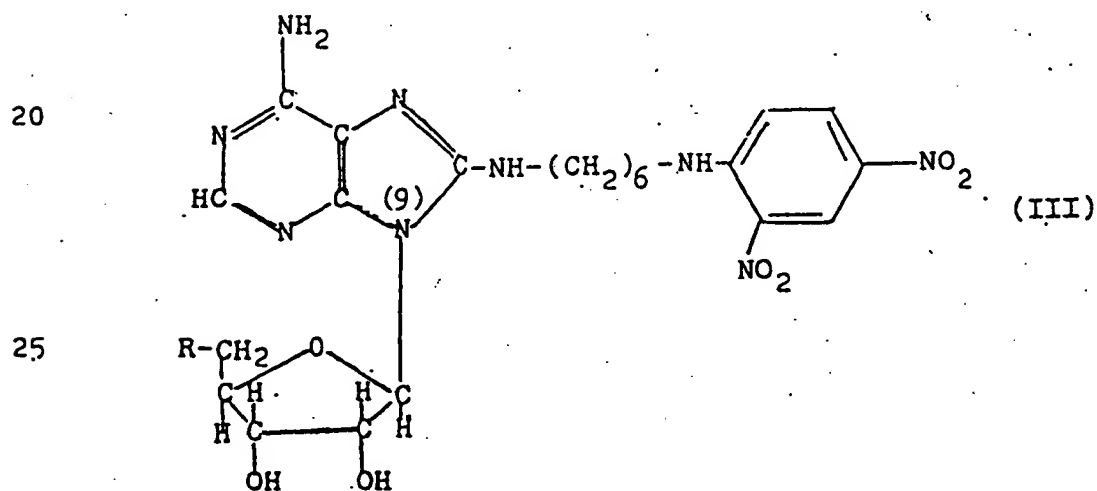
De même, on peut mettre en oeuvre, dans les

applications préférées qui ont été indiquées, de l'UTP ou du CTP modifié par un groupe chimique répondant aux conditions sus-indiquées, en ayant cependant recours au procédé tout à fait différent décrit dans l'article de P.R. LANGER et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 78, No. 11, p. 6633-6637, novembre 1981).

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore au cours de la description d'exemples de mises en oeuvre préférées de l'invention.

10 Préparation du 8-[N-(dinitro-phényl)-amino-hexyl]-aminoadénosine 5'-triphosphate.

On fait réagit du 8-(aminohexyl)-aminoadénosine 5'-triphosphate avec du fluoro-1-dinitro-2,4-benzène, au sein d'un mélange eau-éthanol 10/1 volumes %, à pH 8,8, à 40°C, et en présence d'un sel, notamment chlorure, de magnésium. Le produit de réaction finalement obtenu a pour formule :



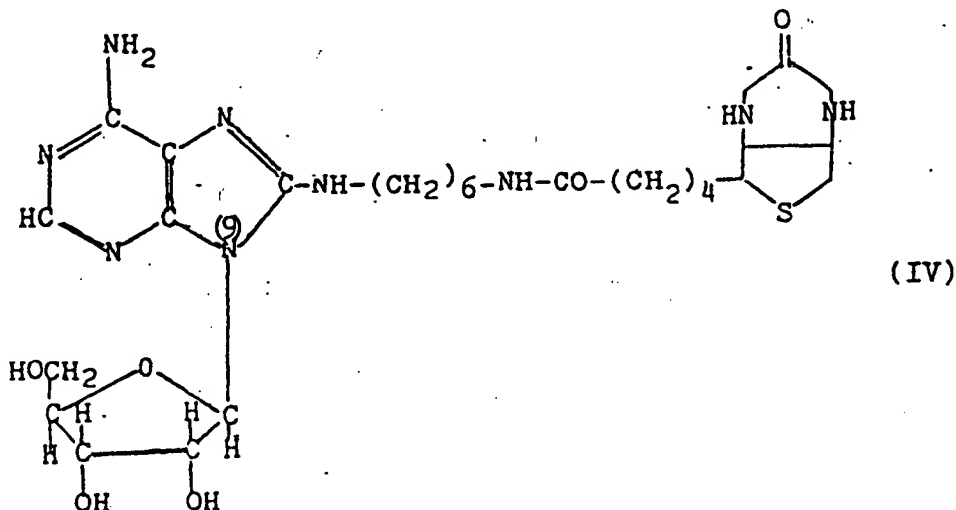
30 On récupère le dérivé de formule III, ci-après dénommé ATP-DNP, après une purification comprenant la fixation du ribonucléotide sur DEAE cellulose, élution avec un gradient de LiCl 0,2 N, pH 5,5, à LiCl 0,5 N, pH 2 et filtration sur tamis moléculaire du type SEPHADEX G50. Le rendement réactionnel est de 52 %. Les fractions recueillies sont analysées par spectrophotométrie d'absorption de rayonnements de lon-

guez d'onde de 280 et 360 nanomètres respectivement. On recueille celle des fractions dont les densités optiques dans les deux susdits domaines de longueurs d'onde sont dans un rapport (DO_{280}/DO_{360}) égal à 4. Le produit contenu dans cette fraction correspond à celui résultant de la fixation de 1 mole de DNP sur 1 mole d'ATP. Il ne donne également qu'une tache dans un système de chromatographie en couche mince. Le produit de cette fraction est lyophilisé.

Ce produit présente la caractéristique d'être reconnu par des anticorps formés au préalable à l'égard de dinitro-2,4 benzène, qui avait préalablement été fixé sur un support macromoléculaire du type de la sérum-albumine. Des anticorps de ce type sont par ailleurs disponibles dans le commerce.

Préparation du 3-(N-biotinyl-aminohexyl)aminoadénosine 5'-triphosphate.

On condense du 8-(aminohexyl)-amino-adénosine-5'-triphosphate avec le biotinyl-N-hydroxysuccinimide-ester, dans les conditions décrites par LANGER et al, telles qu'appliquées à la fabrication du biotinyl-UTP à partir de la 5-(3-amino)allyluridine. On obtient alors le composé de formule :



Fabrication d'un ADN marqué à ses extrémités par des ribonucléotides modifiés.

600 micromoles d'ATP-DNP et 10 microgrammes d'un fragment d'ADN comportant 500 paires de bases sont mis à réagir en présence de 30 unités d'ADN-terminal-transférase à 37°C et pendant 24 heures, au sein d'une solution tampon, dont la composition est la suivante (volume final 200 microlitres):

10 cacodylate de potassium : 100 mM
sérum d'albumine bovine : 1 mg/ml
dithiothreitol : 1 mM
chlorure de cobalt : 1 mM

15 L'ADN retenant à ses extrémités des groupes ATP-DNP est purifié, par passage de la solution sur une colonne du tamis moléculaire commercialisé sous la marque SEPHADEX G 50.

20 Une goutte de cette fraction est déposée sur un filtre de cellulose. Après séchage du filtre, on met celui-ci au contact d'une solution d'anticorps anti-DNP de lapin. L'anticorps non fixé est rincé. Le filtre est ensuite mis au contact d'une solution d'anticorps de lapin liée à de la peroxydase. Après rinçage de l'excès d'anticorps non fixé, on révèle la présence d'anticorps fixés sur le filtre avec une solution d'un substrat pour la peroxydase. Cette solution contient :

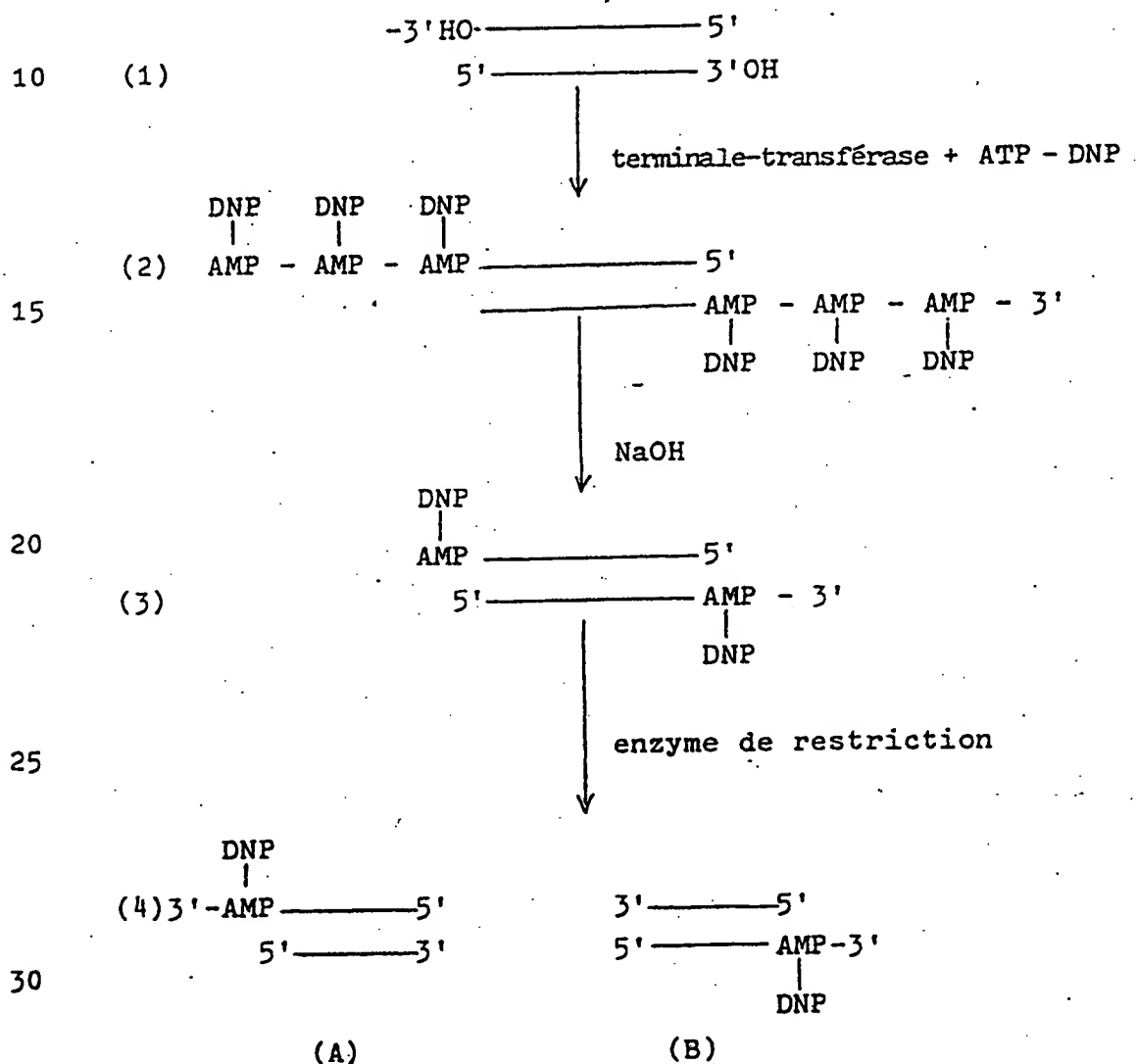
25 - de l'eau oxygénée : 10 µl d'H₂O₂ à 110 volumes,
- de l'acétate de potassium : 9,5 ml 0,05 M, pH 5,1,
- du carbazole : 2 mg pour 0,5 ml de N-N'-diméthylformamide.

30 La présence de l'anti-anticorps de lapin sur le filtrat est alors révélé par la formation d'un précipité brun rouge.

La sensibilité de la méthode est telle qu'elle permet de détecter des quantités extrêmement faibles d'ADN, notamment 380.10^{-4} picomoles.

Application des ADN modifiés conformes à l'invention à l'analyse des séquences de déoxynucléotides qui les constituent.

Les premières étapes de la méthode permettant l'analyse des séquences de nucléotides contenus à l'intérieur d'un ADN déterminé à double-brin sont schématisées ci-après.



L'ADN initial (1) est schématisé par deux traits parallèles comportant l'indication des extrémités respectives 3', 5' de chacun des brins de cet ADN.

Par réaction avec l'ATP-DNP, en présence d'ADN-terminale-transférase, on obtient le fragment

15 .

d'ADN modifié représenté en (2), dont les extrémités 3' portent des oligomères d'AMP-DNP (trois motifs AMP-DNP par oligomère, dans le cas de l'exemple considéré; avec AMP désignant les éléments dérivés du ATP-DMP après l'élimination de deux groupes phosphate par monomère d'ATP-DMP, du fait de l'oligomérisation).

L'ADN ainsi modifié est soumis à une hydrolyse alcaline au sein d'une solution de soude 1 M, à 40 °C, ce grâce à quoi on obtient un ADN modifié, à nouveau récupérable par filtration à travers un tamis moléculaire, ne portant plus à chacune de ses extrémités terminales qu'un seul ribonucléotide modifié (3).

Par action d'une enzyme de restriction, par exemple dans les conditions décrites par MAXAM & GILBERT, on produit deux fragments repérés par A et B en (4). On remarquera que l'on peut évidemment modifier à volonté l'ordre des opérations (2), (3) et (4).

Après isolement et purification par exemple des fragments B, ceux-ci sont répartis en plusieurs lots respectivement soumis aux différentes réactions de clivage différentiel, telles que celles et dans les conditions décrites par MAXAM & GILBERT. Les produits résultant de ces réactions de clivage sélectif sont soumis à des opérations d'électrophorèse sur gel d'acrylamide, dans les conditions décrites par les mêmes auteurs, pour séparer les différents fragments d'ADN, respectivement marqués à leurs extrémités par ordre de tailles, et en différentes bandes.

Conformément à l'invention, on procède ensuite à la révélation des différents fragments marqués par exemple *in situ* dans le gel, par mise en contact de ces derniers avec les solutions d'anticorps, dans les conditions qui ont été indiquées plus haut. On peut aussi transférer au moins en partie les bandes de migrations distinctes sur un filtre de cellulose ou support analogue, par application de ce filtre sur le gel, les différents fragments ou bandes étant alors

détectés sur le filtre lui-même, par exemple dans les conditions qui ont déjà été indiquées plus haut.

On appréciera que cette méthode extrêmement sensible n'implique plus l'utilisation antérieurement
5 nécessaire de plaques de gel extrêmement minces, puisque la détection peut maintenant s'effectuer par visualisation directe des bandes de fractionnement soit dans le gel, soit sur le filtre.

L'invention concerne naturellement les ribo-
10 nucléotides modifiés eux-mêmes lorsqu'ils sont nouveaux. Tel est en particulier le cas pour les ribonucléotides modifiés dans les conditions sus-indiquées, lorsqu'ils sont dérivés de l'ATP.

Comme il va de soi et comme il résulte
15 d'ailleurs déjà de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes d'application et de réalisation qui ont été plus spécialement envisagés ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes.

REVENDICATIONS

1 - ADN modifié par un oligomère de ribonucléotides modifiés, de préférence un ribonucléotide modifié unique, fixé à l'une au moins de ses extrémités, la modification du ribonucléotide lui-même consistant en une
5 molécule chimique fixée de façon covalente à ce ribonucléotide et portant au moins un groupe non engagé dans la liaison covalente susdite et couplable directement ou indirectement avec une molécule ou un produit ayant une affinité spécifique pour ce groupe et permettant sa re-
10 connaissance, ledit groupe étant en outre tel qu'il n'empêche pas un ribonucléotide qui le porte à être fixé à l'extrémité d'un ADN, en présence d'une ADN-transférase terminale, lorsqu'il est mis en contact avec cet ADN, dans des conditions permettant la fixation d'un ou de plu-
15 sieurs ribonucléotides sur cette extrémité.

2 - ADN modifié selon la revendication 1, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification est susceptible d'être reconnu spécifiquement et directement par une autre molécule ou par un produit, lui-même aisément détectable, par une méthode de visualisation.
20

3 - ADN modifié selon la revendication 2, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification est constitué par un antigène ou un haptène susceptible d'être reconnu par un anticorps préalablement formé contre
25 cet antigène ou contre cet haptène.

4 - ADN modifié selon la revendication 1, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification sert de relais vis-à-vis d'une autre molécule ou d'un autre produit susceptible d'être visualisé à son tour.

30 5 - ADN modifié selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification ou, selon le cas, la susdite molécule relais, est couplable chimiquement avec une molécule affine marquée par une enzyme ou immunologiquement avec
35 un anticorps marqué par une enzyme et ayant une affinité

sélective pour ledit groupe de modification ou la susdite molécule relais.

5 6 - ADN modifié selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé par la fixation à l'une au moins de ses extrémités d'au moins un groupe ribonucléotide modifié, dérivé de l'ATP modifié par un groupe de modification fixé de façon covalente sur la position 6, ou de préférence 8, de son groupe adénine, par l'intermédiaire d'un bras du type $-NH-(CH_2)_x-X$, ou
10 $-CO-(CH_2)_x-X$, dans lequel x varie de 2 à 20, notamment de 6 à 12, et X est un groupe assurant la liaison entre un groupe M, choisi parmi ceux qui sont susceptibles d'une réaction de liaison avec un agent chimique ou immunologique ayant une affinité sélective pour
15 ce groupe.

7 - ADN modifié selon la revendication 6, caractérisé en ce que les groupes CH_2 du bras susdit peuvent en partie être remplacés par des groupes CO ou NH, à condition naturellement que ces groupes de remplacement ne soient pas adjacents à des groupes identiques.
20

8 - ADN modifié selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification comprend un groupe dérivé de la biotine, de l'avidine ou un groupe dinitro-2,4-phényle.
25

9 - Procédé de modification d'un ADN comprenant les étapes consistant à traiter ledit ADN avec un ribonucléotide, portant un groupe de modification tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1
30 à 8, en présence d'au moins celui des ribonucléotides normalement susceptible de s'apparier dans un ADN avec le ribonucléotide en question, porteur ou non d'un tel groupe de modification, et d'une ADN-terminale transférase, puis le cas échéant, et lorsque le produit de fixation à l'extrémité de l'ADN résultant de
35 ce traitement consiste en un oligomère de nucléotides modifiés, à éliminer les ribonucléotides modifiés de cet éventuel oligomère, à l'exception du ribonucléo-

tide directement fixé au déoxyribonucléotide terminal d'extrémité de l'ADN en question, de préférence par l'action d'une base alcaline, notamment de la soude, dans des conditions permettant la séparation des liaisons que forment entre eux les ribonucléotides dans ce fragment d'oligomère.

10 - Application de la modification de l'ADN à l'une de ses extrémités par un ribonucléotide portant un groupe de modification tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 8, à l'obtention d'une carte de restriction de cet ADN par action des enzymes de restriction correspondantes, et par récupération, tri et comparaison des tailles des fragments obtenus et portant tous le même ribonucléotide modifié à l'une de ses extrémités.

11 - Application de la modification de l'ADN à l'une de ses extrémités par un ribonucléotide portant un groupe de modification tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 8, à la réalisation d'une analyse de la séquence de nucléotides dont est constitué cet ADN, par un procédé comprenant les étapes consistant à traiter cet ADN avec des agents chimiques permettant d'opérer au sein de cet ADN des clivages différentiels au niveau de certaines bases, à recueillir et à séparer des fragments d'ADN dans un système permettant de les trier par ordre de tailles, et à les faire réagir avec des réactifs permettant la réalisation d'un couplage des groupes chimiques portés par les ribonucléotides terminaux de ceux des fragments qui en portent, avec une molécule ou un produit ayant une affinité sélective à l'égard du groupe chimique de modification desdits ribonucléotides terminaux, en vue de leur visualisation, et à déterminer les nucléotides terminaux non modifiés de chacun de ces fragments d'ADN, eu égard à la nature de l'agent chimique utilisé pour le clivage à son niveau.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR82/00223

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ³		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
IPC ³ : C07H 21/00; C12N 15/00; G01N 33/50		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁴		
Classification System	Classification Symbols	
IPC ³	C07H 21/00; C12N 15/00	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched ⁵		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴		
Category ⁶	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
X	Chemical Abstracts, vol. 96, No. 7, February 15, 1982 (Columbus, Ohio, US), P.R. Langer et al.: "Enzymic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes", see page 207, column 2, ref.: 47771z, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1981, 78(11), 6633-7	1-11
Y	DE, A, 2618511 (MILES), 04 November 1976, see pages 34-119	1
Y	DE, A, 2618419 (MILES), 04 November 1976, see pages 34-62	1
Y	US, A, 42555566 (R.J. CARRICO et al.), 10 March 1981, see column 2, lines 50-70; columns 3, 4	1
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁵</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"A" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search ¹		Date of Mailing of this International Search Report ²
16 March 1983 (16.03.83)		31 March 1983 (31.03.83)
International Searching Authority ¹		Signature of Authorized Officer ¹⁰
European Patent Office		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 82/00223

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ¹		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB. ³ : C 07 H 21/00; C 12 N 15/00; G 01 N 33/50		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁴		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB. ³ :	C 07 H 21/00; C 12 N 15/00	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁵		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁴		
Catégorie ⁶	Identification des documents cités, ¹⁵ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹⁷	N° des revendications visées ¹⁸
X	Chemical Abstracts, vol. 96, no. 7, 15 février 1982 (Columbus, Ohio, US) P.R. LANGER et al.: "Enzymic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes", voir page 207, colonne 2, réf.: 47771z, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1981, 78(11), 6633-7	1-11
Y	DE, A, 2618511 (MILES) 4 novembre 1976 voir pages 34-119	1
Y	DE, A, 2618419 (MILES) 4 novembre 1976 voir pages 34-62	1
Y	US, A, 4255566 (R.J. CARRICO et al.) 10 mars 1981 voir colonne 2, lignes 50-70; colonnes 3,4	1
<p>¹⁴ Catégories spéciales de documents cités: ¹⁵</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« Z » document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée ¹		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale ¹
16 mars 1983		31 MARS 1983
Administration chargée de la recherche internationale ¹		Signature du fonctionnaire autorisé ²
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		G. C. M. Kruyzenberg